## WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

# INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: WO 98/48259 (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: A1 G01N 15/02 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Oktober 1998 (29.10.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/02239

(22) Internationales Anmeldedatum:

16. April 1998 (16.04.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 17 749.2

21. April 1997 (21.04.97)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUN-HOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖLBLIN, Rüdiger [DE/DE]; Heerstrasse 84, D-70563 Stuttgart (DE). GRIMME, Ralf [DE/DE]; Meisenweg 5, D-74385 Pleidelsheim (DE).
- (74) Anwalt: PFENNING MEINIG UND PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE),

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

#### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

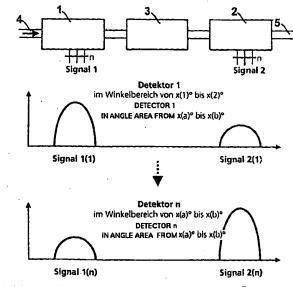
- (54) Title: METHOD AND DEVICE FOR QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ON-LINE DIFFERENTIATION OF BIOTIC AND ABIOTIC PARTICLES
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR QUANTITATIVEN UND QUALITATIVEN ON-LINE-DIFFERENZIERUNG VON BIOTISCHEN UND ABIOTISCHEN PARTIKELN

#### (57) Abstract

The invention relates to a method and a device for quantitative and qualitative on-line differentiation of biotic and abiotic particles. Said methods and devices are used to ensure quality and to monitor production as well as in analysis procedures for particular contamination's of gaseous media. Said methods and devices are chiefly used in pharmacology, food technology, medicine, biotechnology and health care and in controlling maximum admissible concentration values. According to the inventive method, the gas sample to be measured is briefly heated at very high temperatures in a heating chamber (3). Dimensional distribution of particle contamination is determined before and after heating by means of diffuse light sensors (1, 2). Dimensional changes of biotic particles caused by heating make it possible to determine their proportion in total particle load of the gas sample and their composition.

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von Partikeln. Derartige Verfahren und Vorrichtungen werden zur Qualitätssicherung und Produktionsüberwachung sowie als Analyseverfahren für partikuläre Kontaminationen in gasförmigen Medien eingesetzt. Sie werden ins-



besondere im Bereich der Pharmazie, Lebensmitteltechnik, Medizintechnik, Biotechnologie, im Gesundheitswesen sowie zur Überwachung von MAK-Werten verwendet. Das Verfahren besteht in einer kurzzeitigen Erhitzung der zu vermessenden Gasprobe auf sehr hohe Temperaturen in einer Erhitzungskammer (3) und der Bestimmung der Größenverteilung der Partikelkontaminationen vor und nach dieser Erhitzung mittels Streulichtdetektoren (1, 2). Die durch die Erhitzung verursachte Größenveränderung der Partikel biotischen Ursprungs erlauben die Bestimmung ihres Anteils an der Gesamtpartikelbelastung der Gasprobe und ihrer Zusammensetzung.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB.	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR .	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	. IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PΤ	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		•
DK	Dānemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

<u>Verfahren und Vorrichtung zur quantitativen und</u> <u>gualitativen on-line-Differenzierung von biotischen</u> <u>und abiotischen Partikeln</u>

5

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen online-Differenzierung von biotischen und abiotischen Partikeln.

10

15

Derartige Verfahren und Vorrichtungen werden zur Qualitätssicherung und Produktionsüberwachung sowie als Analyseverfahren für partikuläre Kontaminationen in gasförmigen Medien eingesetzt. Sie werden insbesondere im Bereich der Pharmazie, Lebensmitteltechnik, Medizintechnik, Biotechnologie, im Gesundheitswesen sowie zur Überwachung von MAK-Werten verwendet.

20

In diesen Bereichen spielt die biotische partikuläre Kontamination, insbesondere lebende partikuläre Kontaminationen wie zum Beispiel Luftkeime, in gasför- 5

25

30

35

migen Medien wie zum Beispiel Umgebungsluft oder einer Inertgasatmosphäre eine besondere Rolle für die Qualität des Produktes bzw. für die Sicherheit des Produktionspersonals oder des Endverbrauchers und daher ist die Überwachung der Reinheit dieser gasförmigen Medien eine absolute Notwendigkeit und wird in den meisten Fällen zwingend vom Gesetzgeber vorgeschrieben.

Fig. 1 zeigt die prinzipielle Einteilung der partikulären Kontaminationen in gasförmigen Medien in Partikel biotischen Ursprungs sowie abiotischen Ursprungs.
Die Partikel biotischen Ursprungs können weiter unterteilt werden in lebende bzw. bereits tote Partikel. Als tote Partikel treten insbesondere tote Mikroorganismen oder Bruchstücke davon, Hautteile, Produktionsrückstände sowie Haare, Schweiß oder Hautfett
auf. Die noch lebenden Partikel biotischen Ursprungs
bestehen größtenteils aus Mikroorganismen wie Pilzen
oder Bakterien (Luftkeimen) oder auch aus Keimen oder
Sporen von Pflanzen.

Innerhalb von sterilen Produktionen müssen dabei die von der Federal Drug Administration, von der Good Manufacturing Practices-Richtlinie oder dem Blatt 3 der VDI-Richtlinie 2083 vorgeschriebenen besonders strengen Grenzwerte für Partikel biotischen Ursprungs eingehalten werden. Diese Grenzwerte sind in Fig. 2 dargetellt. Durch diese Richtlinien werden weiterhin die Verfahren zur Bestimmung von Luftkeimzahlen vorgeschrieben.

Die nachfolgenden Verfahren beschreiben den Stand der Technik zur Bestimmung von lebenden partikulären Kontaminationen im gasförmigen Medien. 5

15

20

30

35

#### Sedimentation

Bei diesem Verfahren werden Agarplatten in der zu vermessenden Atmosphäre offen ausgelegt. Anschließend werden die absedimentierten Mikroorganismen bestimmt. Eine Spezifizierung kann durch die Verwendung von Selektivnährböden erreicht werden.

#### 10 Filtration

Bei diesem Verfahren werden die in einem Gasvolumen enthaltenen Keime bzw. Keimverbände auf einem Filter abgeschieden, der von dem Gas durchströmt wird. Die Filter werden anschließend direkt auf einem geeigneten Nährboden aufgebracht. Alternativ kann die Filtermembran in einer sterilen physiologischen Nährlösung aufgelöst und diese anschließend gefiltert werden. Das Material der Membran ist zumeist Gelatine oder Celluloseester. Dieses quantitative Meßverfahren wird insbesondere bei sehr hohen Keimzahlen bzw. bei einer gleichzeitigen Überprüfung der Keime auf unterschiedlichen Selektivnährböden eingesetzt.

#### 25 Trägheitsabscheidung

Bei dieser Gruppe von Verfahren werden die Keime in verschiedenen Materialien, beispielsweise in Flüssigkeiten oder auf festen Nährböden abgeschieden. Ein Beispiel für ein derartiges Verfahren ist das Abscheiden der Keime mittels Glas-Impinger. Dieses Verfahren arbeitet nach dem Bubbler-Prinzip, in dem die zu vermessende Luft mit einer hohen Strömungsgeschwindigkeit durch eine Flüssigkeit geleitet wird. Die Luftkeime werden in der Flüssigkeit zurückgehal-

4

ten und die restliche Luft entweicht in Form von Blasen. Aufgrund der hohen Luftgeschwindigkeiten muß der Flüssigkeit Antischaummittel zugesetzt werden. Zur Vermeidung einer ungewollten Vermehrung der Luftkeime in der Flüssigkeit ist eine zügige Weiterverarbeitung unerläßlich.

5

10

15

20

25

30

35

Bei der Abscheidung auf festen Nährböden unterscheidet man zwischen Zentrifugalsammlern, Siebsammlern, Schlitzsammlern bzw. der Elektropräzipitation. Bei den Zentrifugalsammlern wird ein definiertes Luftvolumen durch geeignete Strömungsführung in Rotation versetzt. Die in dem Luftvolumen befindlichen Partikel werden auf einen Agarstreifen aufgeschleudert, welcher sich an der zylindrischen Wand der Meßeinrichtung befindet. Anschließend wird der Agarstreifen bebrütet und wie üblich ausgezählt. Der Siebsammler arbeitet nach dem Prinzip des Mehrstufenimpaktors. Das Probenvolumen wird durch ein System von mehreren in Serie geschalteten Siebplatten angesaugt. Der Lochdurchmesser der einzelnen Siebplatten nimmt in Richtung der Strömungsführung ab und parallel zu den abnehmenden Lochdurchmessern zu. Die luftgetragenen Partikel werden aufgrund ihrer Trägheit und der immer schneller werdenden Strömung abhängig von ihrer Größe auf unterschiedlichen Siebplatten abgeschieden. Es erfolgt so eine Auftrennung der Partikel nach ihrer Größe. Beim Schlitzsammler wird das Probevolumen durch einen Schlitz angesaugt und mit einer hohen Geschwindigkeit auf eine rotierende Nährbodenplatte aufgeschleudert. Bei der Elektropräzipitation wird das Probevolumen gerichtet durch ein Hochspannungsfeld geleitet. Die elektrostatischen Kräfte sorgen hierbei für eine Abscheidung von geladenen Partikeln auf eine rotierende gegenteilig und entgegengesetzt

5

geladene Oberfläche. Diese Oberfläche besteht in der Regel aus einem festen Nährboden, der anschließend bebrütet und ausgezählt wird.

<sup>-</sup> 5

10

15

20

25

30

35

Bei sämtlichen genannten Verfahren müssen die Luftpartikel aufgefangen werden, beispielsweise durch Auslegen von Petrischalen mit festen Nährböden, und anschließend bebrütet werden. Diese Prozedur kann bis zu fünf Tage dauern. Danach erfolgt eine genaue Beschreibung der ausgebrüteten Kulturen und die detaillierte Auswertung der Kontaminationsbelastung der Luft zum Zeitpunkt der Probennahme. Ein direktes Zurückverfolgen der möglichen Ursachen für die Kontaminierung ist durch die zeitliche Verschiebung meist nicht mehr möglich. Die in der Zwischenzeit produzierten und kontaminierten Produkte müssen im schlimmsten Fall komplett entsorgt werden. Nachteilig an den obengenannten Verfahren ist also, daß die Probennahme aufwendig vorbereitet werden muß, die Probe anschließend mehreren Verfahrensschritten unterworfen wird, wodurch sich die Kontaminationsgefahr während des Auswerteverfahrens stark erhöht und daß die Auswertung erst nach einer bestimmten Bebrütungszeit der Kulturen, im Durchschnitt 3 bis 5 Tage, erfolgen kann. Daher sind zumeist auch keine qualitativen Messungen möglich, zumal die Qualität der Messungen vom Verhalten des Bedienungspersonals stark abhängt. Diese Verfahren setzen daher hochqualifiziertes Personal voraus und sind nur gering automatisierbar.

Die JP-A 04-304898 offenbart ein Verfahren zur Bestimmung von Mikroorganismen in gasförmigen oder flüssigen Medien, bei dem der Brechungsindex der Partikel biotischen Ursprungs mit Hilfe einer Wärmebehandlung geändert wird. Aufgrund einer Messung des

5

10

15

20

25

30

35

Brechnungsindexes vor sowie nach dieser Wärmebehandlung wird dann die Anzahl der Partikel biotischen Ursprungs bestimmt. Zur Wärmebehandlung wird das Medium für eine bis zehn Minuten auf 40° bis 80° C erwärmt und anschließend abgekühlt. Optimale Betriebsparameter ergeben sich bei einer Erwärmung für eine bis zwei Minuten auf 70° C. Im Ergebnis wird durch diese Behandlung das Protein der Partikel biotischen Ursprungs denaturiert und dadurch der Brechungsindex geändert. Gemäß der JP-A-04-304898 ändert sich bei dieser Wärmebehandlung die Größe der Partikel biotischen Ursprungs nicht wesentlich und kann daher nicht zur Differenzierung zwischen Partikeln biotischen und abiotischen Ursprungs verwendet werden. Weiterhin nachteilig an diesem Verfahren ist, daß die Dauer der Messungen im 10 Minuten-Bereich und damit zwar verglichen mit den oben geschilderten Verfahren aus dem Stand der Technik relativ kurz ist. Dennoch verhindert die Erwärmungsdauer von ein bis zehn Minuten und die anschließende Abkühlung seinen Einsatz als echtes on-line-Meßverfahren. Aufgrund der immer noch langen Erwärmungsdauer läßt sich lediglich ein Batchverfahren realisieren.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur quantitativen und qualitativen on-line-Differenzierung von biotischen und abiotischn Partikeln in einem gasförmigen Medium zu schaffen, das sehr kurze Reaktionszeiten für eine echte on-line-Messung, eine hohe Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse aufweist und einen hohen Automatisierungsgrad und eine einfache Handhabung ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch das Verfahren und die Vorrichtung nach dem Oberbegriff der Ansprüche 1 und 9 - 5

10

15

20

25

30

35

in Verbindung mit ihren kennzeichnenden Merkmalen gelöst.

Die Lösung der erfindungsmäßen Aufgabe beruht auf einer gezielten Kombination der Bestimmung der Anzahl und Größe der in einem Medium vorhandenen Partikel mit der Veränderung von Partikel biotischen Ursprungs durch eine sehr kurze Erhitzung auf hohe Temperaturen, die oberhalb von 100° C liegen. Aufgrund der hohen Temperaturen ergeben sich lediglich sehr kurze Erhitzungsdauern im Bereich von Sekundenbruchteilen bis wenigen Sekunden. Durch diese Erhitzung schrumpfen die Partikel biotischen Ursprungs, beispielsweise durch Wasserabgabe oder auch mit geringerer Bedeutung Denaturierung der Proteine, und die Größenverteilung der Partikel in dem Medium verändert sich erkennbar. Durch Auswertung dieser Veränderungen ist es möglich, den Anteil von Partikeln biotischen Ursprungs an der Gesamtpartikelbelastung des Mediums unmittelbar innerhalb von Sekunden zu bestimmen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist daher kontinuierlich durchführbar und voll echtzeitfähig und stellt
kein, wenn auch scheinbar kontinuierlich durchgeführtes, Batchverfahren wie im Stand der Technik dar. Die
Reaktionszeiten für das Bedienpersonal auf Änderung
in der Partikelzusammensetzung des Mediums werden
drastisch verkürzt und die Meßergebnisse sehr reproduzierbar. Auch der Wirkungsgrad der Erfassung der
Luftkeime ist aufgrund der hohen eingesetzten Temperaturen sehr groß.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die mit wenigen Komponenten auskommende erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglichen einen modularen, kompakten Geräteaufbau, WO 98/48259

10

15

20

25

30

35

PCT/EP98/02239

8

eine hohe Gerätesicherheit und daher geringe Anlagenkosten sowie Betriebs- und Wartungskosten. Der Automatisierungsgrad dieser echt kontinuierlichen on-line-Messung ist sehr groß und daher ist eine einfache Handhabung des Verfahrens auch durch nicht speziell ausgebildetes Personal möglich.

Die Erfindung ermöglicht ein schnelles Reagieren auf negative Veränderungen bezüglich der partikulären Kontamination biotischen Ursprungs innerhalb gasförmiger Medien, so daß eine effektive Produktionsüberwachung und Qualitätssicherung möglich wird. Auch eine Differenzierung der Kontaminationsart innerhalb der einzelnen Kontaminationsgruppen (biotischer Ursprung bzw. abiotischer Ursprung) ist mit diesem Verfahren möglich. Es ist unmittelbar einsichtig, daß aufgrund des unterschiedlichen Wassergehaltes der Partikel biotischen Ursprungs, beispielsweise Mikroorganismen mit hohem Wassergehalt bzw. pflanzliche Sporen mit extrem niedrigem Wassergehalt, die Temperatur und die Dauer der Erhitzung der Probe gemäß den zu bestimmenden Partikeln angepaßt werden muß. Die genauen einzuhaltenden Bedingungen lassen sich jedoch durch eine einfache Versuchsreihe bestimmen.

Vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie der erfindungsgemäßen Vorrichtung werden in den abhängigen Ansprüchen gegeben.

Eine besonders kurze Erhitzungsdauer sowie eine besonders starke Änderung der Größe der Partikel biotischen Ursprungs ergeben sich bei Temperaturen oberhalb von 200° C oder besser noch 400° C besonders vorteilhaft oberhalb 450° C. Viele Partikel biotischen Ursprungs ändern ihre Größe erst bei einer Er-

- 5

10

15

20

25

30

35

9

hitzung für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb von 200 oder 400° C. Derartige kurzzeitige Hochtemperaturerhitzungen können durch Verwendung eines Röhrchens mit geringem Durchmesser, beispielsweise eine Kapillare, als Erhitzungskammer erzielt werden.

Zusätzlich zur Veränderung der Größe der Partikel biotischen Ursprungs können auch Änderungen weiterer physikalischer Partikelparameter, beipsielsweise des Brechungsindexes oder der Oberflächenstruktur der Partikel biotischen Ursprungs vor und nach der Erhitzung bestimmt und zusätzlich zur Differenzierung und Auswertung der Meßergebnisse herangezogen werden. Mit diesen Informationen kann auch eine Differenzierung innerhalb der Partikel biotischen Ursprungs weiter verbessert werden. Als Meßverfahren eignen sich hier insbesondere zur Bestimmung der Größe der Partikel Streulichtverfahren, wobei die Verwendung einer Mehrwinkelstreulichdetektion eine vollständige Beschreibung und höhere Sicherheit bei der Bestimmung dieser Eigenschaften ermöglicht.

Die Erhitzung der Probe kann vorteilhafterweise mit Hilfe eines Wärmeüberträgers beispielsweise durch Aufheizen des oben beschriebenen dünnen Rohres bzw. der oben beschriebenen dünnen Kapillare erfolgen.

Im folgenden werden einige Beispiele für das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung beschrieben.

Fig. 1 zeigt die Differenzierung der partikulären Kontaminationen in gasförmigen Medien,

	Fig. 2	zeigt die nach verschiedenen Richtli- nien einzuhaltenden Grenzwerte für partikuläre Kontaminationen in gasför migen Medien,
<sub>.</sub>	714 0	
	Fig. 3	zeigt den Aufbau einer erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie ihr Meßprinzip,
10	Fig. 4	zeigt den Aufbau eines erfindungsgemäßen Mehrwinkeldetektors,
15	Fig. 5	zeigt Meßergebnisse vor und nach Er- hitzung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren,
	Fig. 6	zeigt Meßergebnisse nach dem erfin- dungsgemäßen Verfahren,
20	Fig. 7	zeigt weitere Meßergebnisse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, und
	Fig. 8	zeigt weitere Meßergebnisse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.
25	geben die biolo renzierung sowi	wurden bereits oben beschrieben und gischen Grundlagen der Partikeldiffe- e die gesetzlichen Grenzwerte für Par- ionen in Luft wieder.
30	zwei Streuwinke zungskammer 3 z Probe, deren Ko	ne erfindungsgemäße Vorrichtung, die detektoren 1 und 2 sowie eine Erhit- ur Erhitzung der Probe aufweist. Die nzentration an Partikeln biotischen sen werden soll, wird durch einen Ein-
35		sten Streuwinkeldetektor 1 geleitet

WO 98/48259

<sup>-</sup> 5

10

15

20

25

30

35

Dort werden winkelabhängig erste Signale von physikalischen Eigenschaften (wie z.B. Größe, Brechung) der in dem Medium enthaltenen Partikel erzeugt. Anschlie-Bend wird das gasförmige Medium in der Erhitzungskammer 3 erhitzt und anschließend in dem Streuwinkeldetektor 2 erneut gemessen und weitere Signale 2 ausgegeben. Nach dieser Messung wird das gasförmige Medium über den Auslaß 5 des Streuwinkeldetektors 2 aus der erfindungsgemäßen Meßvorrichtung ausgeblasen. Die beiden Diagramme in Fig. 3 zeigen die Meßsignale in Abhängigkeit von der Detektorspannung. Dies entspricht der Größenverteilung der Partikel in der Probe. Fig. 3 zeigt nun, wie sich die Größenverteilung durch die Erhitzung des Gases in der Erhitzungskammer 3 verändert. Dabei stellen die beiden Diagramme die Signale der Streuwinkeldetektoren 1 und 2 unter verschiedenen Streuwinkeln dar. Damit wird zugleich gezeigt, daß das Signal sowie seine Veränderung selbstverständlich von dem Winkel, unter dem das Streulicht beobachtet wird, abhängt. Weiterhin hängt die Streuung selbstverständlich auch von dem zur Erzeugung der von Streulicht auf das gasförmige Medium eingestrahlten Meßlicht ab.

Fig. 4 zeigt einen erfindungsgemäßen Mehrwinkelstreulichtdetektor 1 mit einem Gaseinlaß 4, einem Gasauslaß 8 sowie drei Streulichteinzeldetektoren 10, 11
und 12, die entlang des Umfangs einer Meßkammer 9
angeordnet sind. Der erfindungsgemäße Mehrwinkelstreulichdetektor 1 weist weiterhin eine Laserlichtquelle 6 auf, die einen Laserstrahl 7 erzeugt. Der
Laserstrahl 7 trifft an einer Meßstelle 13 auf den
vom Einlaß 4 zum Auslaß 8 strömenden Gasstrom und
erzeugt dort Streulicht, das unter drei verschiedenen
Winkeln, die durch Pfeile eingezeichnet sind, durch

5.

10

15

20

25

30

12

die drei Detektoren 10, 11 und 12 erfaßt wird. Mit Hilfe dieser unterschiedlichen Detektionswinkel können parallel materialunabhängige (Beugung) und materialabhängige (Brechung, Reflexion) physikalische Eigenschaften erfaßt werden. Durch die Verwendung eines derartigen Mehrwinkeldetektors, der gleichzeitig das Streulichtsignal in mehreren unterschiedlichen, für die Erkennung einzelner physikalischer Effekte geeigneten Winkeln aufnimmt, kann somit eine differenzierte Aussage über die erzielten Veränderungen nicht nur der Größe sondern beispielsweise auch der Formoberfläche oder des Brechungsindexes getroffen werden. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren spielt jedoch die durch eine Erhitzung erzeugte Veränderung der Größe der Partikel die wesentliche Rolle.

Durch die Verwendung von zwei baugleichen Mehrwinkelstreulichtdetektoren zur Bestimmung der Größe der Partikel vor bzw. nach einer Erhitzung auf hohe Temperaturen wird eine Differenzmessung realisiert und die Unterscheidung von Kontaminationen biotischen und abiotischen Ursprungs ermöglicht. Das Ergebnis der Differenzmessung ergibt eine Aussage über die jeweilige Anzahl von Partikeln biotischen und abiotischen Ursprungs in der zu vermessenden Gasprobe. Dies findet seine Ursache darin, daß partikuläre Kontaminationen abiotischen Ursprungs keine Abhängigkeit der Größenverteilung von der Erhitzung zeigen. Daher sind Unterschiede der Messungen vor bzw. nach Erhitzung der Gasprobe ein Maß für die Partikelkontaminationen biologischen Ursprungs und ermöglichen so die genaue Bestimmung der Anzahl Partikel biotischen Ursprungs in der Gasprobe und damit einen direkten Rückschluß

13

auf die Belastung des Mediums beispielsweise mit Luftkeimen.

<sup>-</sup> 5

10

15

20

25

30

35

Fig. 5 zeigt modellhaft die Veränderung der Partikelgrößenverteilung durch eine Erhitzung einer Gasprobe auf 450° C für wenige Sekunden. Fig. 5A zeigt die Häufigkeit n an, mit der Partikel mit einem Durchmesser d in der nicht erhitzten Probe, d.h. in dem Detektor 1 auftreten. Fig. 5B zeigt die entsprechende Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen derselben Gasprobe in dem Detektor 2, d.h. nach Erhitzung des Probenvolumens. Fig. 5C zeigt die Differenz zwischen den beiden beschriebenen Häufigkeitsverteilungen. Es ist leicht ersichtlich, daß die Größe der Partikel biotischen Ursprungs durch die Erhitzung abgenommen hat, so daß der Anteil kleinerer Partikel zugenommen und der Anteil großer Partikel abgenommen hat. Aus dieser Änderung läßt sich nun auf einfache Art und Weise auf die Gesamtzahl der Partikel biotischen Ursprungs in der ursprünglichen Luftprobe schließen.

Fig. 6 zeigt die Abhängigkeit der Größenänderung der Partikel biotischen Ursprungs von der Erhitzungstemperatur. Für diese Messungen wurde eine Mischung aus Microcossus luteus und Latexpartikeln mit einem Durchmesser von 0,74 µm mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Das dargestellte Diagramm zeigt das Streulichtsignal unter einem Streuwinkel von 20° in Abhängigkeit von der Detektorspannung. Dies entspricht der oben geschilderten Häufigkeitsverteilung der Partikelgrößen. Es ist unmittelbar zu sehen, daß lediglich bei einer Erhitzung über 400° C die Größe der Micrococcus luteus-Organismen sich drastisch verringert. Erst bei diesen hohen Erhitzungstemperaturen nimmt der bei

- 5

10

15

20

25

30

35

14

einer geringen negativen Detektorspannung erfaßte großvolumige Partikelanteil stark ab und es entsteht eine scharfe Häufigkeitsspitze bei hohen Detektorspannungen, d. h. bei kleinen Partikelgrößen. Diese bei hohen Temperaturen oberhalb 400° C auftretende Spitze entspricht den durch die Erhitzung in ihrer Größe stark geschrumpften Micrococcus luteus-Mikroorganismen, während die Latexpartikel durch die Erhitzung keine Veränderung ihrer Größe erfahren haben. Dieses Temperaturverhalten bestätigt auch, daß die Änderungen des Streulichtsignals im wesentlichen nicht Änderungen des Brechungsindexes aufgrund von Denaturierung der Proteine der Partikel biotischen Ursprungs widerspiegeln, da in diesem Falle bereits ab ca. 60°C eine Signaländerung zu erwarten wäre.

Fig. 7 zeigt die Veränderung der Größenverteilungen von Micrococcus luteus-Mikroorganismen durch Erhitzung bei unterschiedlichen Temperaturen. Dabei ist Fig. 7A unter einem Streuwinkel von 20°, Fig. 7B unter einem Streuwinkel von 55° und Fig. 7C unter einem Streuwinkel von 90° aufgenommen. Es ist unmittelbar zu sehen, daß die beobachteten Signalveränderungen von dem Beobachtungswinkel abhängen. Weiterhin ist jedoch allen drei Kurven 7A bis 7C zu entnehmen, daß erst bei Temperaturen von über 400° C eine merkliche Veränderung des Signals auftritt. Eine deutliche Veränderung des Signals, die sich für eine Auswertung hervorragend eignet, tritt erst bei Temperaturen um 450° C auf.

Fig. 8 zeigt ein weiteres Beispiel, bei dem das Streulichtsignal von Bazillus subtilis - Sporen unter einem Winkel von 20° nach Erhitzung auf verschiedene Temperaturen gemessen wurde. Obwohl Bazil-

lus subtilis-Sporen einen sehr geringen Wassergehalt haben, läßt sich bei einer Erhitzung auf 400° C oder besser noch auf 450° C eine deutliche Änderung des Streulichtsignales, d. h. der Größenverteilung der Partikel beobachten.

- 5

10

15

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß mit der vorliegenden Erfindung ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Verfügung gestellt wird, bei dem die Partikelkonzentration biotischen Ursprungs von der Partikelkonzentration abiotischen Ursprungs unterschieden und die Belastungen gasförmiger Medien durch Partikel biotischen Ursprungs sehr rasch, on-line und kontinuierlich bestimmt werden können. Dies beruht im wesentlichen auf der durch eine kurzzeitige Erhitzung auf sehr hohe Temperaturen verursachten Größenänderung der Partikel biotischen Ursprungs.

#### Patentansprüche

- Verfahren zur quantitativen und qualitativen on-1. line-Differenzierung von biotischen und abiotischen Partikeln in einem gasförmigen Medium, 5 gekennzeichnet, dadurch daß in einer ersten Meßeinrichtung (1) die Anzahl und Größe der in dem gasförmigen Medium vorhandenen Partikel bestimmt, das gasförmige Medium für kurze Zeit auf Temperaturen oberhalb 10 100° C erhitzt, in einer zweiten Meßeinrichtung (2) die Anzahl und Größe der in dem erhitzten gasförmigen Medium vorhandenen Partikel bestimmt und aus den Ergebnissen der ersten und der zweiten 15 Bestimmung die Anzahl und/oder Größe der biotischen und abiotischen in dem gasförmigen Medium vorhandenen Partikel ermittelt werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb 200° C erhitzt wird.
- Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium für wenige Sekunden auf Temperaturen oberhalb 400° C erhitzt wird.
- 4. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß außer
  der Größenverteilung zugleich weitere physikalische Partikelparameter, beispielsweise die Verteilung des Brechungsindexes der Partikel, bestimmt werden.

17

Verfahren nach mindestens einem der vorhergehen-5. den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren auf einen kontinuierlichen Strom gasförmigen Mediums angewandt wird.

5

Verfahren nach mindestens einem der vorhergehen-6. den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhitzung das gasförmige Medium durch ein dünnes, erhitztes Röhrchen (3) oder Kapillare geleitet wird.

10

Verfahren nach mindestens einem der vorhergehen-7. den Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Verteilung der Größe und/oder des Brechungsindexes der Partikel in dem gasförmigen Medium mittels eines Streulichtverfahren bestimmt wird.

15

Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeich-8. net, daß unter mindestens zwei verschiedenen Winkel das von den Partikeln ausgehende Streulicht (Mehrwinkeldetektion) erfaßt wird.

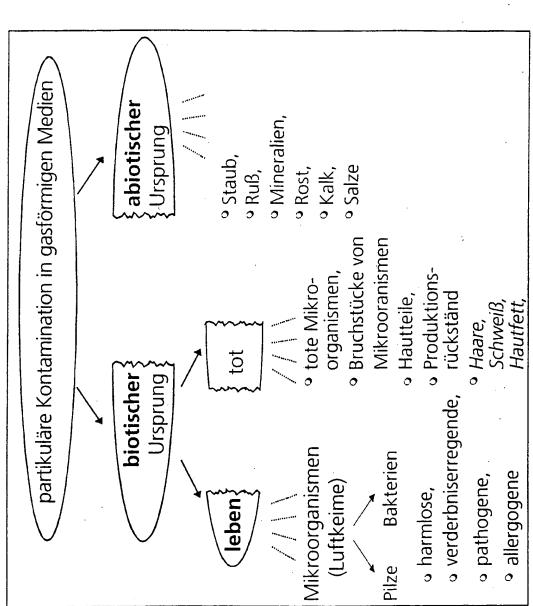
20

Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach 9. einem der vorhergehenden Ansprüche, qekennzeichnet, 25 dadurch daß ein erster und ein zweiter Streulichtpartikelzähler (1, 2) mit je einem Einlaß (4) sowie einem Auslaß (5, 8) für gasförmige Medien sowie eine Erhitzungskammer (3) vorgesehen sind, wobei der Probenauslaß des ersten Streulichtpartikel-30 zählers und der Probeneinlaß des zweiten Streulichtpartikel das gasförmige Medium durch die Erhitzungskammer (3) leitend miteinander verbunden sind.

35

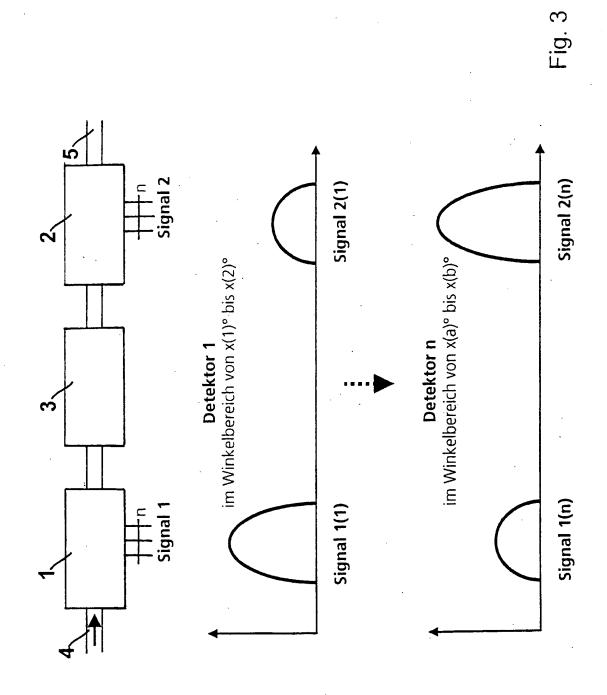
- 10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekenn-zeichnet, daß die Streulichtpartikelzähler (1, 2) Mehrwinkeldetektoren sind.
- 5 11. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhitzungskammer (3) ein dünnes Rohr mit einer Temperatur oberhalb 100° C aufweist.
- 10 12. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr eine Temperatur oberhalb 200° C aufweist.
- 13. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr eine Temperatur oberhalb 400° C aufweist.
- 14. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche
  9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Rohr
  20 eine Kapillare ist.
  - 15. Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche9 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß an demRohr eine Wärmequelle angeordnet ist.

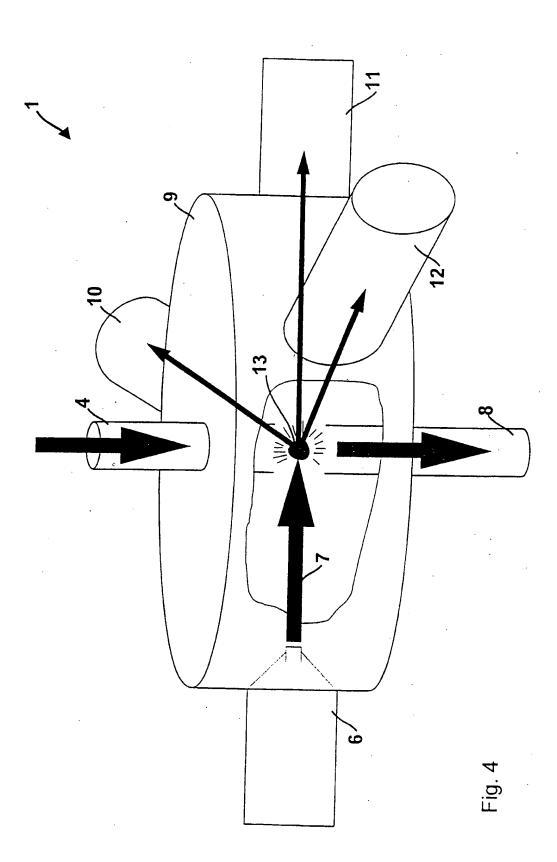




<u>Ті</u>

Reinheits- Bemerki	Bemerkung	Maximal erlaubte	Maximal erlaubte Partikelzahl pro m³	Maximal erlaubte
				pro m³
		> 0,5 µm	> 5 µm	
٧	laminare Luftströmung	3.500	0	<u>.</u>
Δ.	turbulente Luftströmung	3.500	0	S
ပ	turbulente Luftströmung	350.000	2.000	100
Q	turbulente Luftströmung	3.500.000	20.000	500





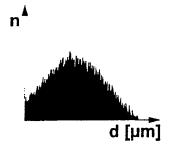


Fig. 5A

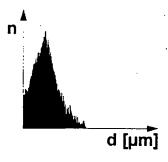


Fig. 5B

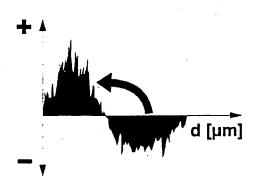
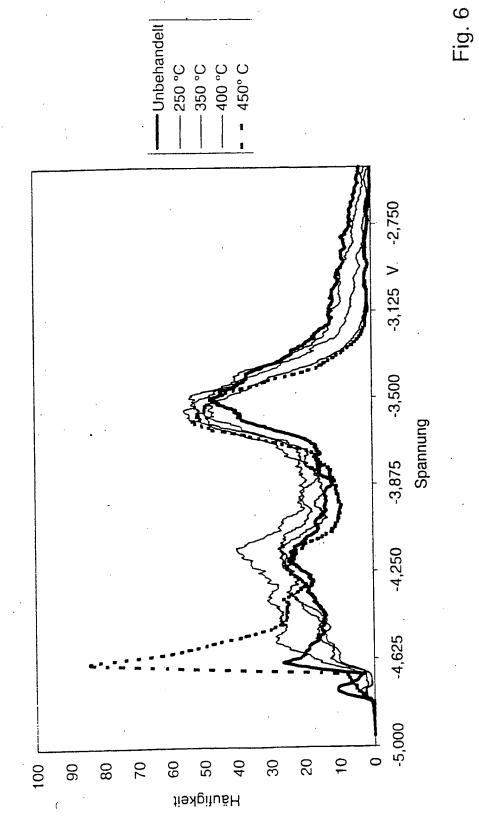
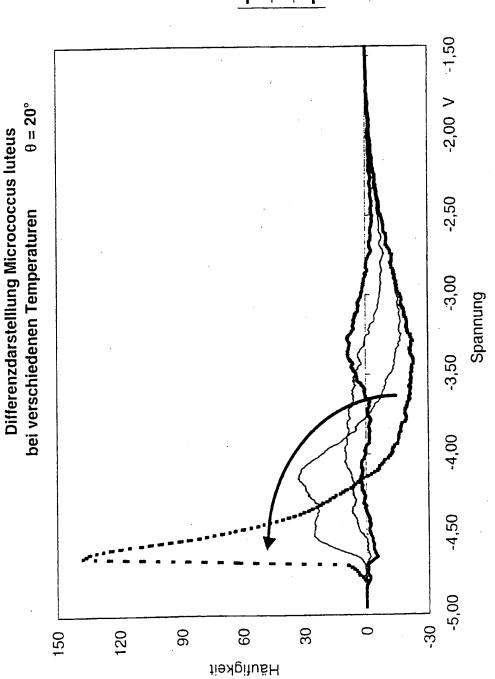


Fig. 5C

Mischung Micrococcus luteus + Latex 0,74  $\mu m$  (1:1) bei verschiedenen Temperaturen /  $\theta$  =  $20^\circ$ 

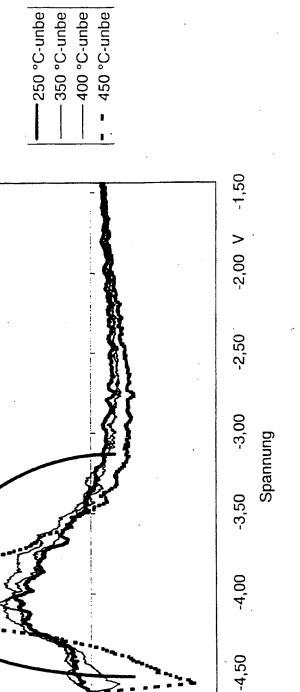






7/10

-250 °C-unbe 350 °C-unbe



-5,00

-50

-10

Differenzdarstelllung Micrococcus Iuteus bei verschiedenen Temperaturen  $\theta$  =  $55^\circ$ 

40

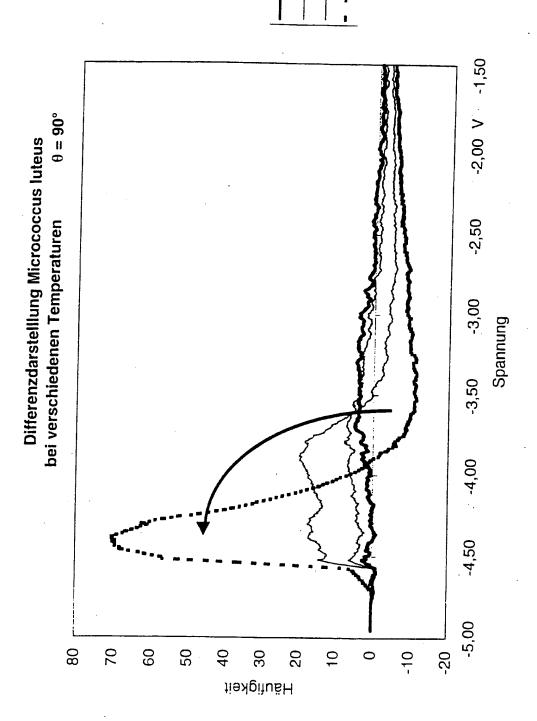
20

30

10

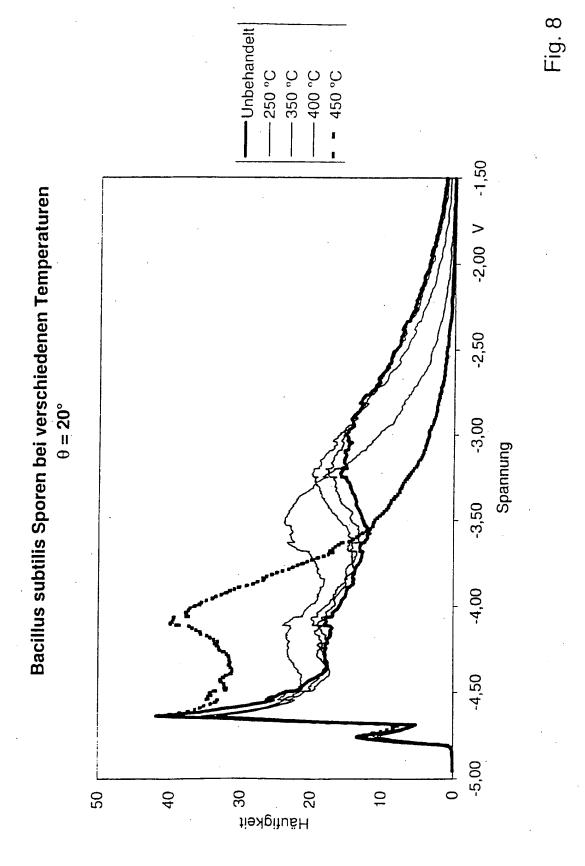
Häufigkeit





9/10

.250 °C-unbe 350 °C-unbe 400 °C-unbe



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ternational Application No

A. CLASS IPC 6	IFICATION OF SUBJECT MATTER G01N15/02		
	to International Patent Classification(IPC) or to both national class	fication and IPC	
	ocumentation searched (classification system followed by classific	ation symbols)	
IPC 6	GO1N	,	
Documenta	ation searched other than minimumdocumentation to the extent the	t such documents are included in the	fields searched
	•		
Electronic o	data base consulted during the international search (name of data	base and, where practical, search te	rms used)
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the	relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 670 137 A (KOSEKI YASUO E	T AL) 2	1,9
	June 1987 see column 2, line 53-68; figur	e 1	
	see column 5, line 57 - column	6, line 3	
	see column 6, line 42 - column figure 7	7, line 8;	
Α	US 4 541 719 A (WYATT PHILIP J)	17	1,9
	September 1985 see column 9, line 59 - column	10, line 14	·
Α	US 4 605 535 A (DIMPFL WILLIAM	I ) 12	1,9
	August 1986 see abstract	-,	
Α	US 5 401 468 A (PATASHNICK HARV	EY ET AL)	1,9
	28 March 1995	<u>.</u> ,	
	see abstract		
Furt	ther documents are listed in the continuation of box C.	X Patent family members a	are listed in annex.
° Special ca	ategories of cited documents:	"T" fater document published afte	
	ent defining the general state of the art which is not dered to be of particular relevance	or priority date and not in co	
	document but published on or after the international	invention "X" document of particular releva	
"L" docume	ent which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another		en the document is taken alone
citatlo	n or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or		nce; the claimed invention blve an inventive step when the one or more other such docu-
other	means ent published prior to the international filing date but		ing obvious to a person skilled
. later t	han the priority date claimed	"&" document member of the san	
Date of the	actual completion of theinternational search	Date of mailing of the internal	tional search report
7	September 1998	15/09/1998	
Name and	mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2	Authorized officer	
	NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fay: (+31-70) 340-3016	Zinngrebe, U	•

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

PCT/EP 98/02239

Patent document cited in search repor	t	Publication date	I	Patent family member(s)	Publication date
US. 4670137	Α	02-06-1987	NONE		
US 4541719	Α	17-09-1985	DE EP	3377013 A 0102726 A	14-07-1988 14-03-1984
US 4605535	Α	12-08-1986	US	4486535 A	04-12-1984
US 5401468	Α	28-03-1995	US US AT DE DE EP JP WO AT CA	5279970 A 5196170 A 5110747 A 160217 T 69223160 D 69223160 T 0638166 A 7505218 T 9322654 A 162625 T 2089758 A,C	18-01-1994 23-03-1993 05-05-1992 15-11-1997 18-12-1997 09-04-1998 15-02-1995 08-06-1995 11-11-1993 15-02-1998 14-05-1992
 			DE DE EP JP WO	69128794 D 69128794 T 0558628 A 7058264 B 9208968 A	26-02-1998 10-06-1998 08-09-1993 21-06-1995 29-05-1992

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

		1	,
A. KLASSI IPK 6	FIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N15/02		
Nach der In	ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klat	ssifikation und der IPK	
	RCHIERTE GEBIETE		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Recherchies IPK 6	rter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbo ${\tt G01N}$	e e e e e e e e e e e e e e e e e e e	
Recherchie	rte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, so	weit diese unter die recherchierten Gebiete	fallen .
Während de	er internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (N	ame der Datenbank und evti, verwendete	Suchbegriffe)
C. ALS WE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab	e der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 670 137 A (KOSEKI YASUO ET Juni 1987 siehe Spalte 2, Zeile 53-68; Abbi		1,9
	siehe Spalte 5, Zeile 53-66; Abbi siehe Spalte 5, Zeile 57 - Spalte 3	e 6, Zeile	
	siehe Spalte 6, Zeile 42 - Spalte 8; Abbildung 7	7, Zeile	
A	US 4 541 719 A (WYATT PHILIP J) 1 September 1985 siehe Spalte 9, Zeile 59 - Spalte	•	1,9
A	Zeile 14 US 4 605 535 A (DIMPFL WILLIAM L) August 1986	12.	1,9
	siehe Zusammenfassung 	,	
		-/	
X Weitr	ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen	X Slehe Anhang Patentfamille	
"A" Veröffer	e Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ntlichung, die den aligemeinen Stand der Technik definiert, icht als besonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht Anmeldung nicht kolfidiert, sondern nur Erfindung zugrundellegenden Prinzips	t worden ist und mit der r zum Verständnis des der
Anmel L" Veröffer	ntlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-	Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeu kann allein aufgrund dieser Veröffentlich	utung; die beanspruchte Erfindung chung nicht als neu oder auf
andere soil od ausgef "O" Veröffer eine Bi "P" Veröffer	lührt) ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, enutzung, eine Aussteltung oder andere Maßnahmen bezieht ntlichung, die vor dem internationalen Aumeldertatum, aber nech	erfinderischer Tätigkeit beruhend betra "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedet kann nicht als auf erfinderischer Tätigk werden, wenn die Veröffentlichung mit Veröffentlichungen dieser Kategorie in diese Verbindung für einen Fachmann "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben	dung, die beanspruchte Erlindung eit beruhend betrachtet einer oder mehreren anderen Verbindung gebracht wird und nahellegend ist
Datum des A	Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Re	cherchenberichts
7	. September 1998	15/09/1998	
Name und P	Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk	Bevollmächtigter Bediensteter	
	Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Zinngrebe, U	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

	ang) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Potr Apenguah Ma
Kategorie° A	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Telle  US 5 401 468 A (PATASHNICK HARVEY ET AL)	Betr. Anspruch Nr.
	28. März 1995 siehe Zusammenfassung	
•		
		·
•		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

'ernationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/02239

Im Reche angeführtes F	rchenberich Patentdokur		Datum der Veröffentlichung		litglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 467	70137	Α	02-06-1987	KEI	NE	
US 454	41719	A	17-09-1985	DE EP	3377013 A 0102726 A	14-07-1988 14-03-1984
US 460	05535.	Α	12-08-1986	US	4486535 A	04-12-1984
US 540	01468	A	28-03-1995	US US AT DE DE JP WO AT CA DE JP WO	5279970 A 5196170 A 5110747 A 160217 T 69223160 D 69223160 T 0638166 A 7505218 T 9322654 A 162625 T 2089758 A,C 69128794 D 69128794 T 0558628 A 7058264 B 9208968 A	18-01-1994 23-03-1993 05-05-1992 15-11-1997 18-12-1997 09-04-1998 15-02-1995 08-06-1995 11-11-1993 15-02-1998 14-05-1992 26-02-1998 10-06-1998 08-09-1993 21-06-1995 29-05-1992

# This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

# **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

# IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**☐** OTHER: \_\_\_\_\_

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.